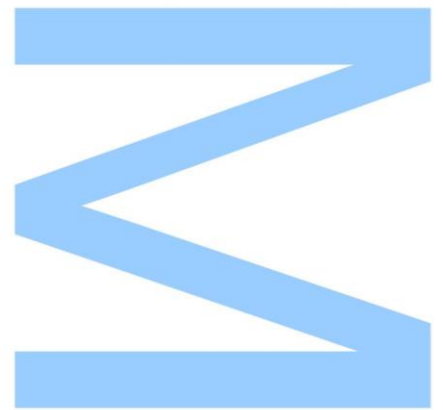




Amendoeira na bacia do Baixo Sabor



Tiago Miguel Ramos Rachado

Mestrado em Engenharia Agronómica

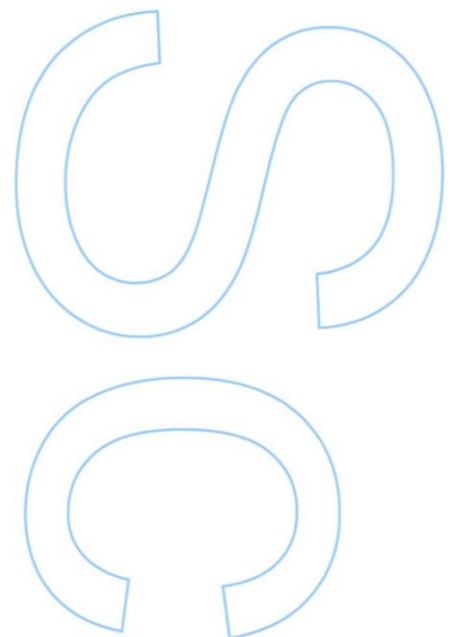
Departamento de Geociências, Ambiente e Ordenamento do Território
2017

Orientador

Prof. Dra. Maria Eugénia dos Santos Nunes, Professor Auxiliar, Faculdade
Ciências da Universidade do Porto

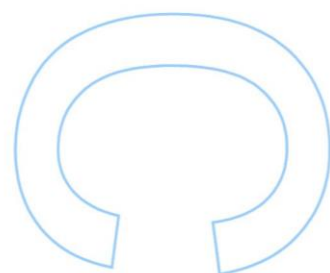
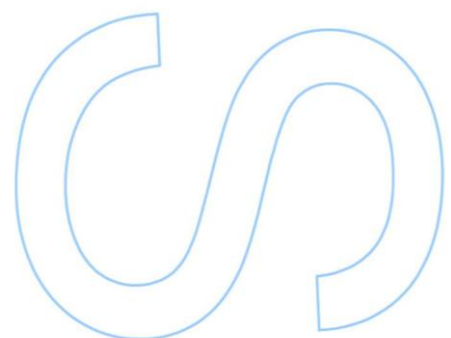
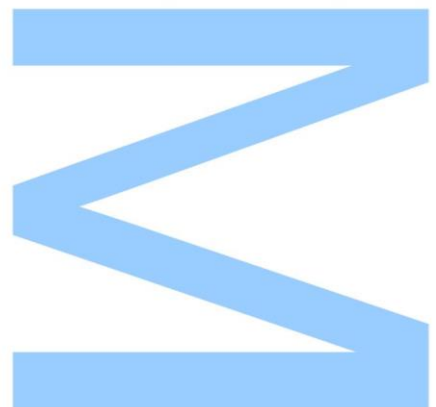
Coorientador

Prof. Dra. Ilda da Conceição Abreu de Noronha, Professor Associado com
Agregação, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto



Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.
O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Este reduzido espaço utilizo para agradecer a todos os que de forma mais direta ou menos participativa contribuíram para que fosse possível a realização de todos os trabalhos que formam esta dissertação.

À minha orientadora a Professora Doutora Eugénia dos Santos Nunes, não só por ter aceitado a minha proposta de trabalho, mas também pela forma como me encaminhou para todos os locais e pessoas que deram seguimento a elaboração dos estudos, pela dedicação e paciência, pelo profissionalismo e por todo o ensinamento académico.

Ao Engenheiro Augusto Assunção, da Direção Regional de Agricultura de Entre Douro e Minho, que fez a ponte de contacto com a Quinta do Valongo em Mirandela, disponibilizou os mapas das variedades que se encontram na coleção de variedades, sugeriu estudos e mostrou disponibilidade total a todos os momentos.

A Professora Doutora Ilda de Noronha, que dedicou o seu precioso tempo e partilhou um conhecimento e ajuda que foram fulcrais na elaboração dos estudos com os grãos de pólen.

Ao Banco Português de Germoplasma Vegetal e a todas as pessoas que nele trabalham, principalmente à Engenheira Ana Barata, que me aceitou e proporcionou as condições para que pudesse elaborar o estudo sobre micropropagação e a Engenheira Isabel Silva pela orientação e cooperação no trabalho realizado no BPGV. A todos os novos amigos ali encontrados.

Aos colegas de mestrado da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

À minha mãe.

Ao meu pai.

Ao meu irmão, cunhada e sobrinhos pelo simples facto de existirem.

Resumo

A amendoeira (*Prunus dulcis*, Miller), planta da família *Rosaceae* com origem no médio oriente é uma árvore tipicamente mediterrânica. Em Portugal encontramos o seu cultivo com expressão no Algarve e Trás-os-Montes, existindo diversas variedades dispersas pelas regiões. Na região do Baixo Sabor as variedades regionais que mais se utilizaram em plantações anteriores a meados dos anos 1990, foram a Casa Nova (Sebastião Guerra), Parada (Refego ou Branquinha) e Verdeal, ocasionalmente encontram-se as variedades Bonita e Fura Sacos. Recentemente a área de amendoal tem vindo a aumentar de forma entusiástica mas com a introdução de variedades como a Guara, Ferraduel, Lauranne entre outras, as variedades regionais incorrem sérios riscos de ser erradicadas da flora Transmontana.

Neste sentido, o trabalho pretende perceber quais e até que ponto podem ser interessantes a nível competitivo na sua utilização as variedades tradicionais tendo como foco a floração, a fertilidade do pólen, potencialidade para a micropropagação *in vitro* e observação da interação com o porta-enxerto *gf677*. Através do acompanhamento fenológico, da recolha de flores e de rebentos leva-se a cabo um conjunto de estudos que nos podem ajudar na escolha das variedades a utilizar e as características que se destacam para a plantação e produção.

Palavras – chave:

Fenologia; Pólen; Micropropagação; Porta-enxerto *gf677*

Abstract

The almond tree (*Prunus dulcis*, Miller), plant of the family Rosaceae with origin in the Middle East is a typically Mediterranean tree. In Portugal we find its cultivation with expression in the Algarve and Trás-os-Montes, existing diverse cultivars dispersed by the regions. In the region of Baixo Sabor, the regional cultivars that were most used in plantations prior to the mid-1990s were Casa Nova (Sebastião Guerra), Parada (Refego or Branquinha), Verdeal and occasionally the cultivars Bonita and Fura Sacos. Recently the area of almond has been increasing enthusiastically with the introduction of varieties such as Guara, Ferraduel and Lauranne among others, and the regional cultivars incur serious risks of being eradicated from the flora Transmontana.

In this sense, the work intends to understand which and to what extent they can be interesting at a competitive level in their use the traditional varieties, focusing on flowering, pollen fertility, potential for *in vitro* micropropagation and observation of the interaction with the rootstock *gf677*. Through the phenological monitoring, the collection of flowers and shoots is carried out a set of studies that can help us in choosing the varieties to use and the characteristics that stand out for planting and production..

Keywords:

Phenology; Pollen; Micropropagation; Rootstock *gf677*

Índice

Abstract.....	iii
Índice	iv
Índice de tabelas	v
Índice de figuras.....	v
Lista de abreviaturas	vii
1. Introdução	1
2. Revisão do estado de arte.....	3
2.1 O cultivo da amendoeira	3
2.2 Descrição morfológica das variedades de Amendoeira.	4
2.3 Fenologia	6
2.4 Fertilidade do pólen de amendoeira	8
2.5 Propagação <i>in vitro</i>	10
2.6 Resposta das variedades regionais ao porta-enxerto gf677	11
3. Material e Métodos.....	12
3.1 Variedades de <i>Prunus dulcis</i> utilizadas no estudo.....	12
3.2 Localização	13
3.3 Descrição do estudo.....	14
4. Resultados e Discussão	20
4.1 Estádios Fenológicos	20
4.2 Germinação <i>in vitro</i> do pólen.....	22
4.3 Micropropagação <i>in vitro</i> das variedades regionais	23
4.4 Resposta da variedade ao porta-enxerto gf677	26
5. Conclusões gerais.....	28
6. Referências	29

Índice de tabelas

Tabela 1 - Variedades utilizadas no estudo	12
Tabela 2- Número de amendoeiras e flores utilizadas na colheita	15
Tabela 3- Constituição dos meios de germinação de pólen	16
Tabela 4- Número de explantes de <i>Prunus dulcis</i> colhidos nas duas datas de recolha	17
Tabela 5- Composição dos 2 meios de cultura utilizados no material colhido para micropropagação in vitro.....	18
Tabela 6- Composição dos 2 meios de enraizamento utilizados no material estabelecido in vitro	18
Tabela 7- Percentagem de germinação do pólen nos meios testados em 2016.....	22
<i>Tabela 8 – Número de ápices e entrenós inoculados, número de ápices e entrenós contaminados e número de ápices e entrenós estabelecidos, do Meio 1 da primeira colheita - I1</i>	<i>24</i>
<i>Tabela 9- Número de ápices e entrenós inoculados, número de ápices e entrenós contaminados e número de ápices e entrenós estabelecidos, do Meio 2 da primeira colheita – I2</i>	<i>24</i>
<i>Tabela 10- Número de ápices e entrenós inoculados, número de ápices e entrenós contaminados e número de ápices e entrenós estabelecidos, do Meio 1 da primeira colheita – I3</i>	<i>24</i>

Índice de figuras

Figura 1 - Diferentes portes de formação das variedades de Amendoeira.....	4
Figura 2 - O Fruto de Amendoeira, forma com casca e a forma do grão.....	5
Figura 3 - Localização das variedades tradicionais a azul e da variedade introduzida a vermelho. Fotografia retirada do GoogleMaps.	13
Figura 4- Quinta do Valongo, Mirandela onde se encontra a coleção das variedades regionais de amendoeira (<i>Prunus dulcis</i>). Fotografia retirada do GoogleMaps.	14
Figura 5- Zona de corte de explants para micropropagação in vitro.....	16

Figura 6- Esquema ilustrativo do comportamento de interação entre o porta-enxerto gf677 e a variedade acoplada.	19
Figura 7 - Quadro de acompanhamento fenológico desde a dormência até à queda das pétalas nas variedades de Amendoeira.....	20
Figura 8 - Desenvolvimento das variedades Casa Nova, Parada, Verdeal, Guara e P. amara desde o aparecimento do cálice até à queda das pétalas, em 2017.....	21
Figura 9- Valor médio da percentagem de Viabilidade e Germinação do pólen, utilizando o Meio C em 2017.	22
Figura 10- explantes estabelecidos (1 e 2), contaminado (3) e morto (4).....	25
Figura 11- Resposta da variedade Casa Nova ao porta-enxerto gf677.	26
Figura 12- Resposta da variedade Parada ao porta-enxerto gf677.	26
Figura 13- Resposta da variedade Verdeal ao porta-enxerto gf677.	26
Figura 14- Resposta da variedade Bonita ao porta-enxerto gf677.	26
Figura 15- Resposta da variedade Fura Sacos ao porta-enxerto gf677.	27

Lista de abreviaturas

IBA - ácido indolilbutírico

MS - Meio de Murashige e Skoog, 1962

BAP - 6- benzilaminopurina

PEG 400 - polyethylene glycol 400

MES - ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico

1. Introdução

A amendoeira, *Prunus dulcis* (Miller), é uma árvore de folha caduca que pertence ao reino *Plantae*, classe *Magnoliopsidae*, à família das *Rosaceae*, subfamília das *Prunoideae*, género *Prunus* L. cujo fruto seco comestível é a amêndoa (Grasselly *et al.*, 1997; Monteiro *et al.*, 2003). Esta espécie é originária das zonas áridas e montanhosas da Ásia Central de onde se expandiu para todo o mundo, sendo bem-adaptada aos climas de Invernos suaves e húmidos e Verões quentes e secos, da bacia Mediterrânica e da América Norte onde apresenta maior importância económica (Monteiro *et al.*, 2003). Trata-se de uma espécie tipicamente mediterrânica.

Em Portugal a amendoeira é uma cultura que ocupava em 2013 uma área de cerca de 28 mil hectares e nesse mesmo ano a produção registada foi de cerca de 4500 toneladas de amêndoa (INE, 2013). Trás-os-Montes é das principais regiões produtoras a nível nacional, estando a produção concentrada, predominantemente, nos concelhos de Torre de Moncorvo, Alfandega da Fé, Mogadouro e Valpaços. A área de cultivo de amendoeira tem sofrido um energético aumento, refletindo-se não só nas candidaturas a novos investimentos agrícolas submetidas nas associações (AATM, 2016), das quais, mais de 70% se destinam a produção de amêndoa, como também na procura de plantas junto dos fornecedores locais (superior a 100 000 plantas anuais, Eng. Francisco Fevereiro e Moncorvagri Soc. Unipessoal, Lda: comunicação pessoal). A falta de produção de plantas a nível nacional faz com que a procura das variedades seja feita maioritariamente em Espanha e Itália, ficando a plantação restrita a variedades estrangeiras tais como Guara, Ferragnez, Ferraduel e Lauranne, em detrimento das variedades regionais como Casa Nova, Parada, Verdeal, Bonita e Fura Sacos, adaptadas às condições e tradições transmontanas. Junto do leito do rio Sabor, na União de Freguesias de Felgar e Souto da Velha, concelho de Torre de Moncorvo, ainda se podem encontrar alguns amendoais com variedades tradicionais.

Com este trabalho pretende-se:

Acompanhar a floração, registando a evolução dos botões florais ao longo do tempo de três variedades regionais com maior expressão na bacia do Baixo Sabor, (União de Freguesias de Felgar e Souto da Velha; Concelho de Torre de Moncorvo).

Identificar variedades com interesse para o mercado de investimento, com base na fertilidade do pólen.

Desenvolver plantas *in vitro* para micropropagação de variedades regionais e testar o seu comportamento em dois tratamentos.

Observar o comportamento das variedades com o porta-enxerto *gf677*

2. Revisão do estado de arte

2.1 O cultivo da amendoeira

A amendoeira é uma árvore que se adapta perfeitamente ao clima mediterrânico, estando o seu cultivo mais expressamente representado em toda a orla do mediterrâneo, no Central Valley da Califórnia e no Middle East dos EUA, na Ásia Central, Encostas dos Himalaias e no Hemisfério Sul (Chile, Argentina, África do Sul e Austrália). Sendo o principal produtor o Central Valley na Califórnia Estados Unidos da América (Alonso *et al.*, 2012).

Duas características do clima mediterrânico são a irregularidade e o défice hídrico na estação quente, o que mostra a resistência e adaptação da planta as estas condições sendo umas das principais culturas na bacia do Baixo Sabor que representa bem esse clima. Nos amendoais tradicionais o regadio é quase inexistente o que pode explicar a baixa produtividade, que segundo Afonso Martins da UTAD/CITAB em (Jornadas Técnicas da Amêndoa, 23 de maio 2014, Alfândega da Fé, Casa da Cultura) seria cerca de 0,34 T/ha. Já nos amendoais mais recentes o recurso a sistemas de rega gota-a-gota simples ou mais avançados onde se junta fertilização e programação tem sido uma tendência (Moncorvagri Soc. Unipessoal, Lda, 2016)

O ciclo da planta inicia-se geralmente no final do mês de janeiro nas plantas mais precoces até ao início de mês de março nas variedades mais tardias e completa-se após a apanha do fruto que coincide com a queda da folha que se pode perlongar até meio do mês de outubro, com a entrada no estado de dormência da planta. Durante o estado de dormência, nos meses de novembro a início de janeiro procede-se a poda em seco, associada a poda de renovação e formação da planta onde se eliminam ramos envelhecidos, com necroses ou sobrepostos. Durante a primavera e verão faz-se a poda em verde para eliminar rebentos ladrões da planta (Assunção, 2014).

A venda da produção de amêndoa por parte dos agricultores tem sido, nos últimos anos, muito facilitada pois os grossistas e armazenistas compram o produto de porta em porta, ficando o transporte a cargo dessas entidades, como por exemplo a Pabi-Euroamêndoa. O preço oscila conforme o mercado internacional e o fruto paga-se pelo rendimento do grão com casca vs grão. Assim, para cálculo do rendimento é selecionado um número aleatório de amêndoas do lote em venda, pesadas com a

casca, britada e separado o grão que é pesado posteriormente a solo. Então, o peso da amêndoa (grão mais casca) equivale a 100% do rendimento, o peso do grão solo será a percentagem de rendimento.

2.2 Descrição morfológica das variedades de Amendoeira.

Utilizando os descritores morfológicos, segundo Mantas *et al.* (1994) e Monteiro *et al.* (2003), caracteriza-se a árvore pelo porte (ramificação, estrutura, posição relativa dos ramos), a flor (forma, cor, densidade e época de floração) e o fruto (forma da amêndoa e do grão). Classifica-se o porte entre muito ereto e prostrado (Figura 1), contudo e de referir que a poda, fundamental na formação e condução da planta, pode interferir com a classificação segundo esta característica.

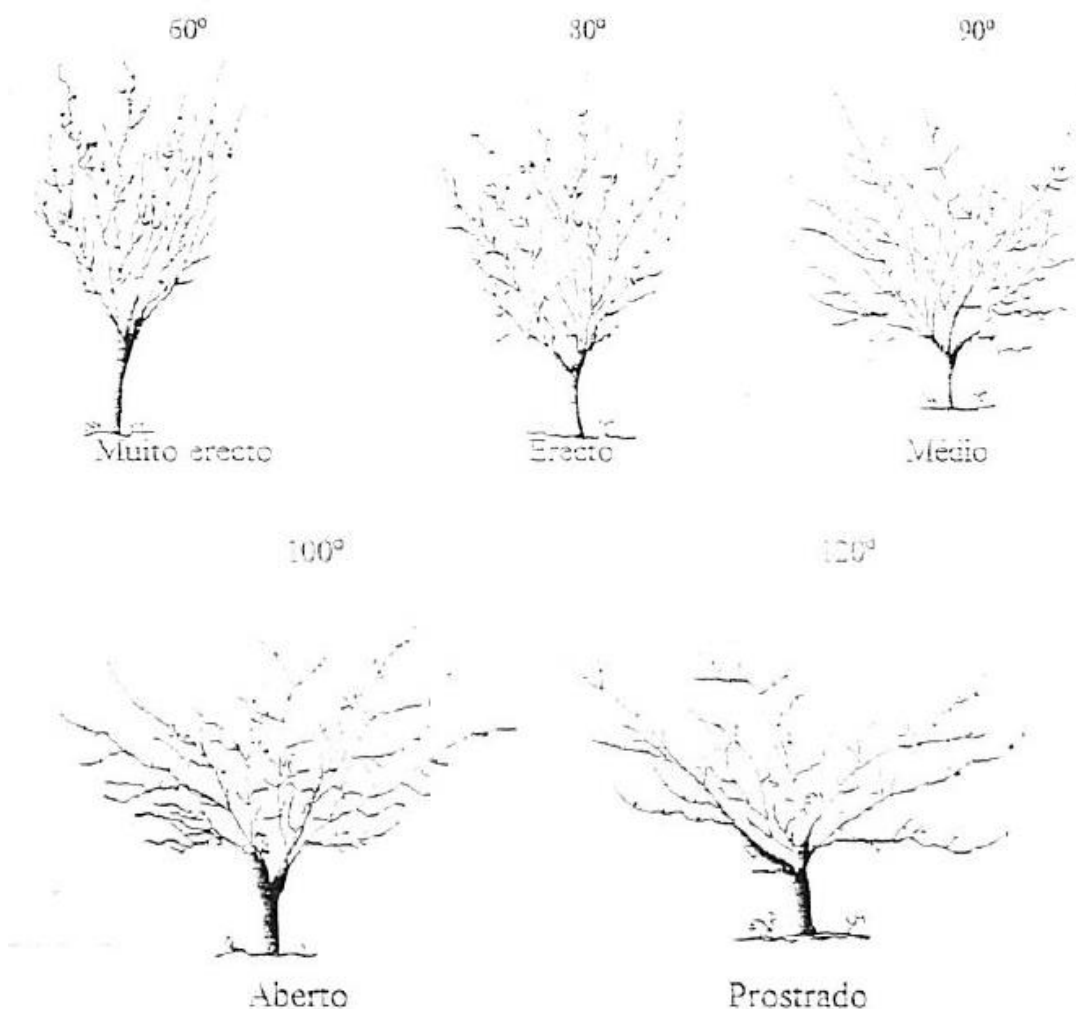


Figura 1 - Diferentes portes de formação das variedades de Amendoeira.

A copa pode ser classificada entre pouco ramificada a muito ramificada e quanto à estrutura pode ser fechada ou aberta. Consoante a inserção dos ramos, estes podem-se classificar pendentes ou eretos. Os gomos florais podem ser arredondados ou cónicos e com diferentes colorações. A cor das pétalas varia de branco a rosa com diferentes tonalidades, bem como a forma que varia consoante a variedade. A densidade de floração classifica-se como pouco abundante a muito abundante. A época de floração classifica-se entre muito precoce e muito tardia.

A forma do fruto e da semente compreendem um aspeto desde comprido a redondo (Figura 2) e a forma condiciona a utilização da amêndoa, sendo as mais arredondadas preferíveis para cobertura de forma oval (amêndoa da páscoa) e as mais alongadas para cobrir com açúcar (doçaria típica de Torre de Moncorvo).

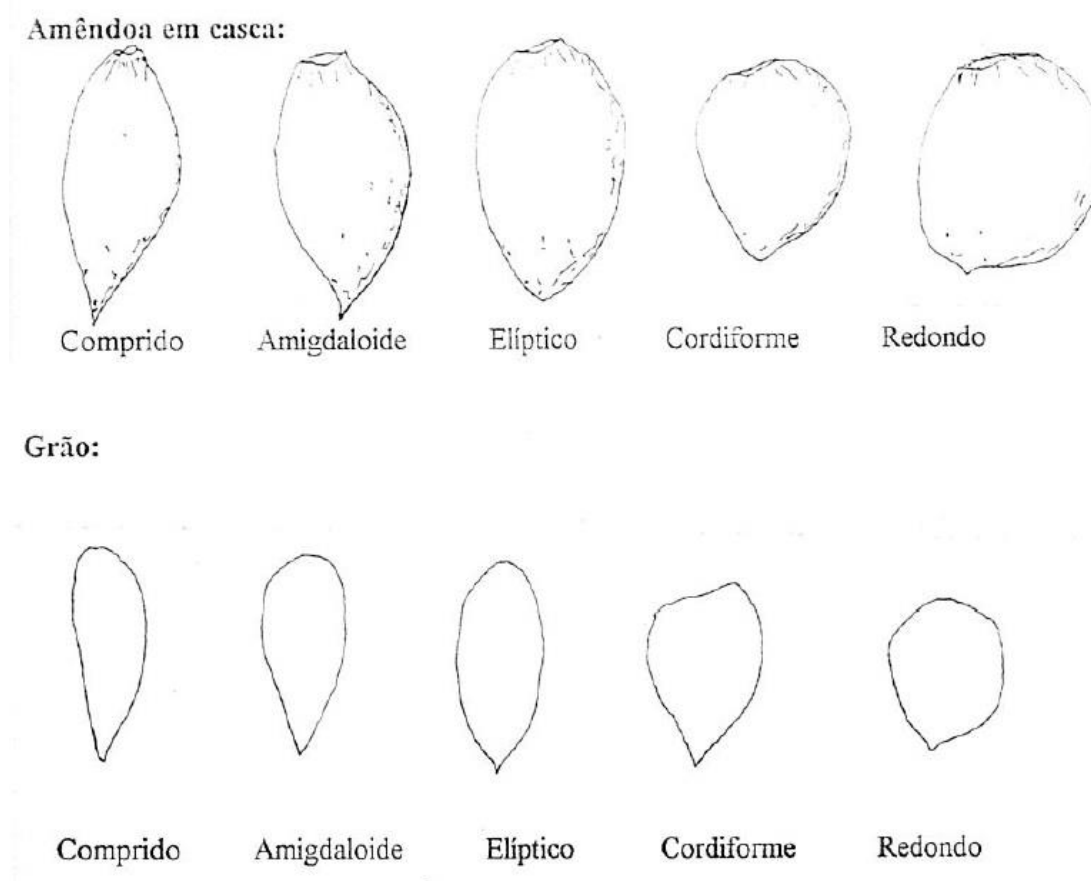


Figura 2 - O Fruto de Amendoeira, forma com casca e a forma do grão

2.3 Fenologia

A ciência que estuda as variações biológicas ocorridas durante um determinado período de tempo e a sua relação com o meio em que estão inseridas é a fenologia. Estes eventos biológicos, nas plantas, referem-se a uma determinada etapa do seu ciclo, o estado fenológico comporta por exemplo: abrolhamento, floração, maturação, senescência foliar (Leith, 1974).

Nos climas temperados, o desenvolvimento floral da amendoeira, inicia-se no final do verão ocorrendo a indução e formação dos gomos florais. Período este que está relacionado com a produtividade da planta, uma vez que o número dos futuros gomos dependerá das condições climáticas e do próprio estado nutricional da planta. Durante o outono a planta diminui a sua atividade metabólica ao indispensável para sobreviver e os gomos florais entram em dormência, (Fuchigami & Kobayashi, 1982). O estado de dormência é muito importante, quando o período entre meados de outubro a meados de janeiro são bastante frios, pois permitem a resistência dos gomos a características ambientais mais adversas e impede o seu crescimento aquando da ocorrência de alturas com temperaturas um pouco mais elevadas. O período de desenvolvimento dos gomos florais até à floração está diretamente relacionado com a temperatura, (Chuine *et al.*, 2003). Os gomos florais retomam a sua atividade após a interrupção do período de dormência que coincide, na amendoeira, com o culminar dos períodos de temperaturas menos favoráveis. Esta quebra da dormência pode variar cronologicamente entre variedades de *Prunus dulcis*.

A produção de fruto, nas variedades de Amendoeira, está diretamente ligada a floração, pois é da flor que se obtém o fruto e o conhecimento dos tempos de floração permite escolher as variedades que melhor se enquadram com as condições de produção.

Assim, desde o abrolhamento até à floração podem ser caracterizados os seguintes estádios fenológicos:

Gema de Inverno: O gomo encontra-se em estado de dormência, de cada um deles sairá uma flor.

Aparecimento do Cálice: Nesta fase o gomo já se encontra em evolução e crescimento.

Abertura da Flor: Evidenciam-se as pétalas e o botão floral começa a abrir.

Plena Floração: Temos a flor completamente aberta de forma homogénea pela copa da árvore.

Queda das Pétalas: A queda das pétalas marca o final da floração.

2.4 Fertilidade do pólen de amendoeira

Nos meses de janeiro a março, a floração da amendoeira representa um dos cartazes mais atrativos da região. As autarquias locais fazem coincidir esta época alta para o turismo com atividades festivas e uma série de eventos que proporcionam o deleito dos visitantes. Contudo, o efeito espetacular das árvores repletas de flores nem sempre reflete uma produção espetável de amêndoa.

A floração e sua polinização são fenómenos importantes para a frutificação da amendoeira. Qualquer problema que ocorra durante esta época pode interferir diretamente com a quantidade de colheita, assim é importante o estudo dos fatores relacionados com a floração. A avaliação da fertilidade polínica é uma informação importante para o estudo da biologia da fecundação, nomeadamente, a nível da capacidade de germinação e viabilidade do pólen após exposição a determinados fatores ambientais. A comparação da fertilidade polínica intervarietal ajuda a determinar quais as variedades mais indicadas para uma determinada região e quais as suas potencialidades no sentido de se proceder ao melhoramento genético ou seleção clonal (Dafni & Firmage, 2000).

A viabilidade e a capacidade de germinação do grão de pólen variam sob influência de fatores genéticos, ambientais e fitotécnicos. A baixa temperatura no período da floração impede o pólen de germinar no estigma não ocorrendo a formação do tubo polínico (Boavida *et al.*, 2007). O grão de pólen pode estar viável mas não germinar, quando submetido a fatores que interfiram com o seu desenvolvimento (Dafni & Firmage, 2000).

As metodologias usualmente utilizadas para caracterizar e avaliar a fertilidade polínica englobam técnicas de coloração, ensaios de germinação *in vitro* e a verificação, em condições naturais, da capacidade de fecundação e formação do fruto (Stanley & Linskens, 1974). Na avaliação da viabilidade podemos observar a integridade do grão de pólen, através de várias técnicas de coloração dos constituintes citoplasmáticos, assim como por avaliação da atividade enzimática. Alguns autores recomendam a utilização da técnica fluorocromática que avalia a integridade do plasmalema do grão de pólen através da reação de diacetato de fluoresceína (FDA) com a enzima esterase, que quando viável emite fluorescência, (Dafni & Firmage, 2000; Heslop-Harrison *et al.*, 1984).

A germinação do pólen leva à formação e crescimento do tubo polínico que transporta os gâmetas masculinos até a oosfera presente no saco embrionário de modo a que possa ocorrer a fecundação. Na amendoeira, como em todas as árvores de fruto, o sucesso da produção depende do sucesso deste evento. No laboratório, é necessário preparar meios de cultura com composição semelhante às condições do estigma para que o grão de pólen germine. Ele precisa de hidratação, pois o grão de pólen é libertado para a atmosfera desidratado. Necessita também como elemento chave para a germinação ser bem-sucedida e formar o tubo polínico, de hidratos como fonte de energia (Daher *et al.*, 2009). Para isso é utilizada a sacarose, não só para a manutenção da pressão osmótica do meio mas também como substrato para o metabolismo do grão de pólen. Na literatura, a percentagem ótima de sacarose varia de espécie para espécie. O boro desempenha também um papel importante para a germinação do pólen e crescimento do tubo (Stanley & Linskens, 1974). A deficiência em boro pode conduzir a uma redução na taxa de germinação do pólen, retardamento do tubo e até mesmo ao aparecimento de anomalias durante o seu desenvolvimento. Por vários autores tem sido referido que uma concentração de 100ppm de ácido bórico é necessária para o êxito da germinação do pólen para a maioria das espécies (Kwack & Brewbaker, 1961). As concentrações mais elevadas podem inibir a germinação dos grãos de pólen e o alongamento do tubo polínico (Potts & Marsden-Smedley, 1989; Wang *et al.*, 2003).

2.5 Propagação *in vitro*

A cultura de tecidos é uma ferramenta importante na rápida multiplicação de plantas em espaços de reduzidas dimensões que nos permite obter indivíduos geneticamente iguais à planta que lhe deu origem e, para além disso, permite-nos a obtenção de clones isentos de vírus (Ferreira *et al.*, 1998). Tem também como vantagens a manutenção do genótipo e fenótipo, conhecimento sobre mutações ou produção de variedades genéticas selecionadas, excelente estado fitossanitário das plantas obtidas, rápida propagação clonal, produção em massa geneticamente idêntica e fisiologicamente uniforme (Titon *et al.*, 2006). Este método oferece ainda, excelentes possibilidades para a propagação comercial de plantas, possibilitando a obtenção de grande número de indivíduos a partir de um número reduzido de explantes (Bonga *et al.*, 1992). Vários meios básicos têm sido utilizados na multiplicação de plantas, sendo que a maioria se baseia no meio Murashige e Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962). A propagação pode ser afetada por diversos fatores tais como, o meio de cultura (Silveira, 2001), e o tipo e a concentração de reguladores de crescimento utilizados para a indução de respostas morfogenéticas (Peres, 2002; Schuch & Erig, 2005). Esta é uma técnica com várias fases, desde a entrada do explante no laboratório até à saída da planta para o seu habitat final. Inicia-se esta técnica com a desinfeção dos explantes, seguindo-se o estabelecimento da cultura, a multiplicação, a formação de raízes (enraizamento) e, por fim, a aclimatização. A fase de enraizamento determina o sucesso da aclimatização das plantas quando transplantadas para a casa de vegetação (Rocha *et al.*, 2008). No caso da amendoeira, as raízes formadas *in vitro* podem ser morfologicamente normais, mas podem apresentar distúrbios fisiológicos (Filiti *et al.*, 1987). A cultura de tecidos *in vitro* de amendoeira tem sido objeto de vários estudos (Rugini & Verma, 1983; Antonelli, 1992).

Em 1986, a amendoeira era considerada uma das maiores culturas arvenses do mundo. A sua plantação em pé franco é algo muito pouco usual, estando quase sempre ligada a um porta-enxerto, que também é frequentemente produzido *in vitro*. A enxertia *in vitro* pode ser adotada como técnica de rejuvenescimento, por proporcionar resultados com maior rapidez e eficiência em comparação à enxertia *ex vitro*, uma vez que plantas com menores dimensões e mais juvenis são utilizadas (Bandeira *et al.*, 2007). Assim, a propagação de amendoeiras de variedades com interesse comercial torna-se prática comum visando a obtenção de sementes de enxertia.

2.6 Resposta das variedades regionais ao porta-enxerto gf677

A enxertia é uma técnica que junta duas partes de plantas, geralmente uma parte radicular e de suporte (cavalo) e outra parte superior com o interesse para o utilizador (cavaleiro). Uma das dificuldades na introdução de novas variedades de porta-enxerto é a incompatibilidade entre porta-enxerto, que detém a parte radicular e a variedade que representa a copa da planta e a zona de frutificação. Um dos problemas da enxertia é a formação visível do calo que pode levar ao deficiente desenvolvimento do sistema vascular da planta, (Pereira *et al.*, 2014). A utilização de porta-enxerto de forma generalizada teve início na Itália e alastrou-se pela Europa a partir dos anos 60, assumindo maior importância com o desenvolvimento da fruticultura industrial (Reighard *et al.*, 2008). As características procuradas num porta-enxerto são, entre outras, compatibilidade com a variedade enxertada, boa adaptação ao tipo de solo e clima, maior resistência as doenças e pragas, vigor adequado e maior eficiência na absorção de água e nutrientes. No cultivo do amendoeira é recorrente o uso de porta-enxerto que possibilitam o cultivo de variedades em locais de difícil ou quase impossível adaptação das variedades. O *gf677*, um híbrido resultante do cruzamento de *Prunus amygdalus* × *P. pérsica* (Dimassi-Theriou, 1970), é um porta-enxerto resistente à deficiência de ferro (Fe), adequado para solos pouco férteis e secos (Monticelli *et al.*, 2000). Trata-se do porta-enxerto mais utilizado e foi selecionado por Bernhard et Grasselly, no INRA de Bordéus (Monteiro *et al.*, 2003). Por definição, a incompatibilidade da enxertia é a incapacidade de formar a perfeita união entre o porta-enxerto e a copa, ou ainda a incapacidade de uma planta enxertada crescer normalmente, levando à ocorrência da morte prematura do enxerto devido a algum tipo de intolerância fisiológica a nível celular (Moore, 1984; Hartmann *et al.*, 1990; Salaya, 1999).

3. Material e Métodos

3.1 Variedades de *Prunus dulcis* utilizadas no estudo

Para o acompanhamento e registo dos estádios fenológico, foram utilizadas três variedades tradicionais de produtores locais existentes na bacia do Baixo Sabor - Casa Nova, Parada e Verdeal, uma variedade de amêndoa amarga e uma variedade introduzida, Guara (Tabela 1).

Nos estudos da viabilidade e germinação do pólen de amendoeira, micropropagação *in vitro* e resposta da variedade ao porta-enxerto *gf677*, utilizaram-se variedades existentes no Centro Experimental da Terra Quente em Mirandela, na Quinta do Valongo, onde se encontra um campo de reportório genético com variedades regionais - Casa Nova (Sebastião Guerra, Marcolina), Parada (Refego, Branquinha), Verdeal, Bonita e Fura Sacos e as estrangeiras mais comuns que foram introduzidas em Portugal nos últimos anos, tal como a Guara (Tabela 1). Ali foram recolhidas amostras de pólen, rebentos jovens para a micropropagação e observada e fotografada a interação com o porta-enxerto *gf677*.

Tabela 1 - Variedades utilizadas no estudo

VARIEDADE	SINONÍMIAS
CASA NOVA	SEBASTIAO GUERRA; MARCOLINA
PARADA	REFEGO; BRANQUINHA
VERDEAL	
AMENDOA AMARGA	
BONITA	
FURA SACOS	
GUARA	

3.2 Localização

Na bacia do Baixo Sabor foram selecionados 3 produtores, para o estudo de três variedades regionais, com áreas compreendidas entre 0,3 e 3 ha. Num amendoal de 2ha do Senhor António Teixeira, utilizaram-se duas variedades, Casa Nova (com maior relevância em área de plantio) e Parada (Refego ou Branquinha), também muito utilizada pelos produtores e utilizada em alternância com a variedade Casa Nova. No amendoal de 0,3 ha do Senhor Ademar Rebouta, utilizou-se a variedade Verdeal que, apesar de ser menos frequente é também encontrada em vários amendoais tradicionais (Figura 3). Finalmente no amendoal de 3 ha do Senhor José Rachado, utilizou-se a variedade introduzida Guara, que se encontra presente na maioria das plantações de amendoal com menos de 25 anos (Figura 3). Foi também acompanhada uma variedade de amêndoa amarga que nasceu espontaneamente num passadiço entre dois terrenos com variedades tradicionais, pouco acima da cota 234 da bacia do rio Sabor.

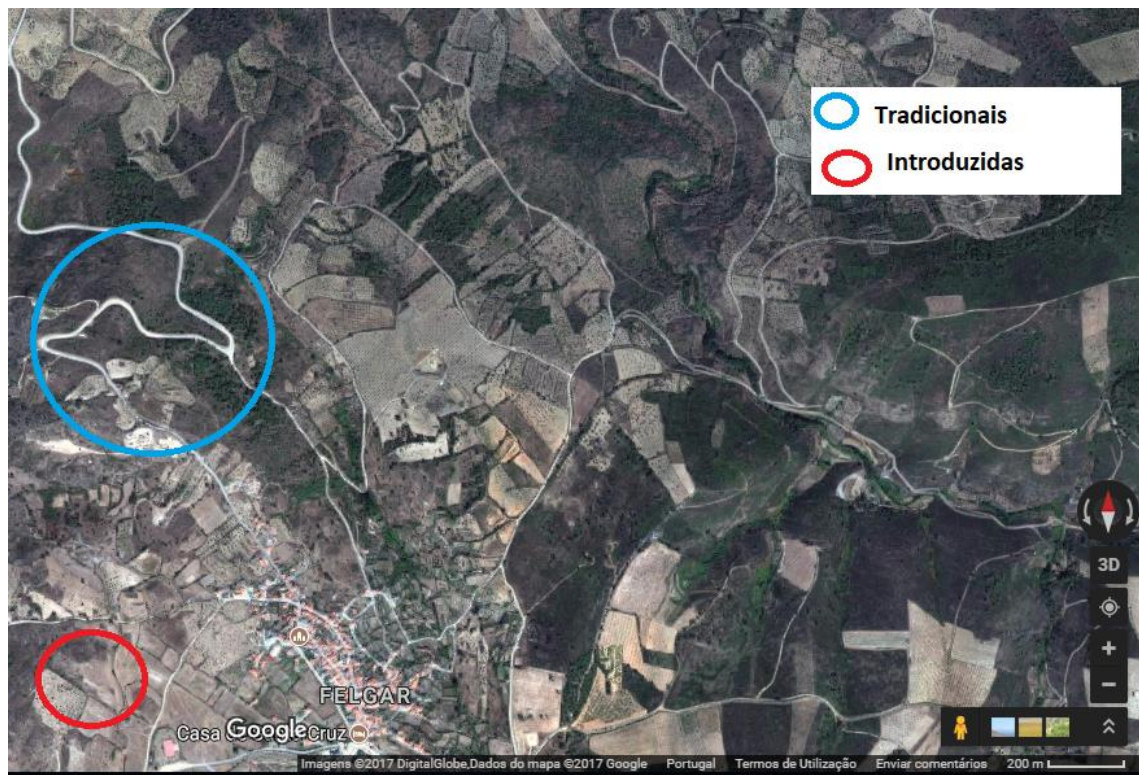


Figura 3 - Localização das variedades tradicionais a azul e da variedade introduzida a vermelho. Fotografia retirada do GoogleMaps.

Na Quinta do Valongo, Mirandela (Figura 4), encontra-se a coleção de variedades de amendoeira (*Prunus dulcis*) regionais e introduzidas, e o nosso estudo incidiu nas variedades Casa Nova, Parada, Bonita, Fura Sacos e Verdeal.



Figura 4- Quinta do Valongo, Mirandela onde se encontra a coleção das variedades regionais de amendoeira (*Prunus dulcis*). Fotografia retirada do GoogleMaps.

3.3 Descrição do estudo

De cada uma das variedades na bacia do Baixo Sabor, foram aleatoriamente identificadas 9 árvores e marcado um ramo. Da variedade amarga, apenas foi selecionada uma árvore mas foram marcados 3 pontos em diferentes exposições da copa. Efetuaram-se observações semanais nos ramos de cada uma das amendoeiras previamente identificadas para a monitorização dos estádios fenológicos, presença de polinizadores, intervenções humanas e outros fenómenos que possam influenciar o bom desenvolvimento da árvore e do fruto, e a caracterização morfológica.

A colheita de flores e recolha de pólen feita na coleção de variedades de amendoeira na Quinta do Valongo, Mirandela, nos anos 2016 e 2017, utilizaram-se as variedades Casa Nova, Parada, Verdeal, Bonita e Fura Sacos. As flores foram recolhidas em sacos de papel devidamente identificados e foram levadas para o

laboratório de Palinologia da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Em seguida retiraram-se as anteras das flores e para facilitar a libertação do pólen, secaram-se numa estufa a 24°C durante 24h. O pólen recolhido foi colocado em microtubos e usado nos ensaios. Em 2016 a recolha de flores foi tardia estando já a época de floração no final. Daí que o material recolhido foi utilizado unicamente para testar os meios de germinação e subsequente escolha do mais apropriado. O pólen obtido em 2017 foi utilizado para avaliar a viabilidade e a germinação *in vitro*. O número de flores utilizadas no estudo segue a tabela (Tabela 2).

Tabela 2- Número de amendoeiras e flores utilizadas na colheita

VARIEDADE	NÚMERO DE AMENDOEIRAS	NÚMERO DE FLORES POR AMENDOEIRA
CASA NOVA	3	20
PARADA	2	30
VERDEAL	3	20
BONITA	3	20
FURA SACOS	3	20

O pólen de cada variedade, isolado previamente, foi colocado em placas Petri contendo 5ml de meio de germinação e mantido em estufa a 25°C na obscuridade durante 24h. Foram retiradas 2 amostras de cada placa de germinação e fez-se a observação e quantificação ao microscópio ótico (DMLB: Leica) em três campos de 100 grãos de pólen. Considerou-se a germinação de um grão de pólen quando o tubo polínico era mais longo do que a dimensão do pólen (Nepi *et al.*, 2000).

Para a determinação da capacidade de germinação do pólen foram testados em 2016, 4 diferentes meios: Meio A, composto pelo tampão NaOH/(MES 0,5M), Sacarose 10%, PEG 400 15%, Ácido Bórico 100ppm e pH 6,04; Meio B é exatamente igual ao Meio A mas sem a adição do tampão MES e pH 6,01; Meio C, constituído por Sacarose 15%, Ácido Bórico 100ppm e agar 0,5%; e Meio D com Sacarose 10%, Ácido Bórico 100ppm e agar 0,5% (Tabela 3). O meio com melhores resultados foi selecionada para efetuar os testes de germinação em 2017.

Tabela 3- Constituição dos meios de germinação de pólen

Meio	NaOH/MES	Sacarose	PEG 400 15%	Ácido Borico 100 ppm	Agarose 0,5%
A	x	10%	x	x	
B		10%	x	x	
C		15%		x	x
D		10%		x	x

No âmbito da avaliação do comportamento das variedades de *Prunus dulcis* perante a micropropagação *in vitro*, efetuaram-se colheitas em duas datas distintas, a 10 de maio de 2016 (I1 e I2), 1 de junho de 2016 (I3), nas mesmas árvores de 5 variedades, Casa Nova, Parada, Verdeal, Bonita e Fura Sacos, em Mirandela na Quinta do Valongo (Figura 5).

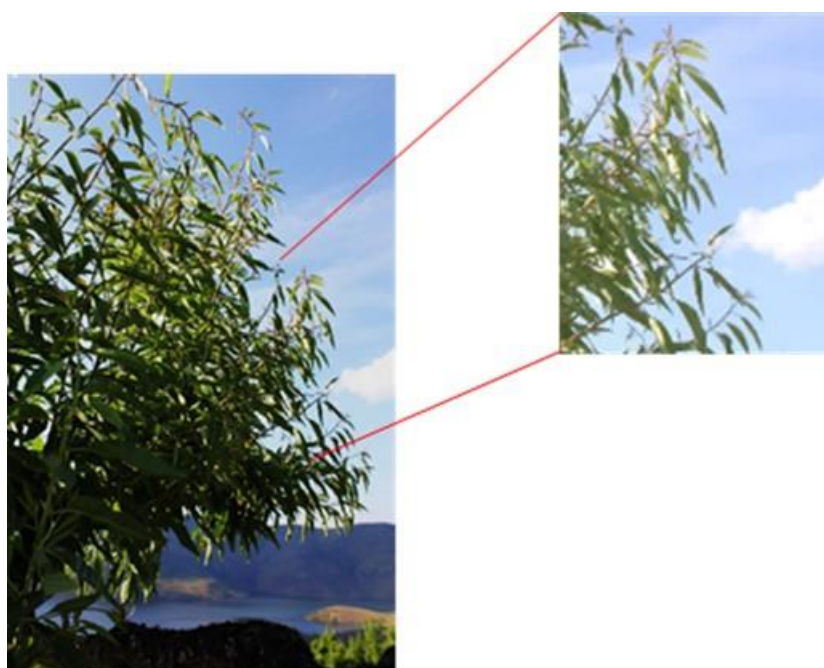


Figura 5- Zona de corte de explants para micropropagação *in vitro*.

Na primeira colheita foram obtidos 20 *explantes* de cada variedade (Tabela 4). A precipitação em Mirandela, nesse dia foi de 16 mm com uma temperatura máxima de 17°C e mínima de 11°C. Os 4 dias que antecederam tiveram uma precipitação média de 58,5 mm e temperaturas de 15,75°C de máxima e 9,5°C de mínima (accuweather, 2016). Na segunda colheita foram obtidos 10 *explantes* de cada variedade (Tabela 4). Este dia caracterizou-se meteorologicamente por não ter ocorrido precipitação, e uma

temperatura máxima de 26°C e 16°C de temperatura mínima. Os quatro dias que antecederam a colheita de 1 de junho de 2016 tiveram uma precipitação média de 17,25 mm sendo que mais de 94% desta pluviosidade ocorreu no dia mais distante dos 4 antecedentes ao dia da colheita e as temperaturas médias foram de 19,25°C máxima e 13,25°C mínima (accuweather, 2016). Os explantes colhidos foram armazenados em caixas de EPS (esferovite), que posteriormente foram colocadas numa mala térmica e imediatamente transportadas para o laboratório.

Tabela 4- Número de explantes de prunus dulcis colhidos nas duas datas de recolha

Variedade	10 de maio de 2016	1 de junho de 2016	Total
Casa Nova	20	10	30
Parada	20	10	30
Verdeal	20	10	30
Bonita	20	10	30
Fura Sacos	20	10	30

Os *explants* resultantes da primeira colheita foram cortados em segmentos de 4 a 6 cm de comprimento, lavados em água corrente durante aproximadamente 10 minutos, esterilizados em duas soluções - etanol 70% durante 30 segundos e hipoclorito de Sódio 10% durante 10 minutos. Posteriormente foram lavados três vezes durante de 5 minutos com água desionizada num copo de vidro em agitação.

Os *explants* da segunda colheita, cortados em segmentos de 4 a 6 cm de comprimento, foram lavados em água corrente e esterilizados, primeiro numa solução a 5% de Hipoclorito de Sódio e algumas gotas de detergente comercial (Tween), durante três vazas de tempo (5, 10 e 60) minutos sendo depois mergulhados numa solução constituída 1 ml de Tween (20%), 40 ml de bicloreto de mercúrio (2g/L) e água desionizada até perfazer 100mL, onde permaneceram em agitação por 15 minutos. Finalmente foram lavados três vezes em água desionizada durante 5 minutos num copo de vidro em agitação.

Procedeu-se depois ao corte dos *explants* em segmentos com 1,5 a 2 cm de comprimento, do entrenó (E) e ápice (A). Cada *explant* resultante dos entrenós e ápices foi colocado individualmente em tubos de vidro de 20 ml e cultivados em 5ml de meio de cultura (Tabela 5).

Os *explants* da primeira colheita (I1) e da segunda (I3) foram cultivados no meio de cultura M1 e os *explants* da primeira colheita (I2) no meio de cultura M2.

Tabela 5- Composição dos 2 meios de cultura utilizados no material colhido para micropropagação *in vitro*

	M1 (1000 mL)	M1 (1000 mL)	M2 (1000 mL)
MS	4,31 g/L	4,31 g/L	2,16 g/L
Sacarose	30 g/L	30 g/L	30 g/L
BAP	1mg/L	1 mg/L	1 mg/L
Agar	7 g/L	7 g/L	7 g/L
Material Colhido	I1	I3	I2

Numa fase posterior, foram selecionados os *explantes* estabelecidos e submetidos a 2 tratamentos de enraizamento: R1 - os *explants* dos tratamentos I1 e I2 foram colocados em 2,16 g/L de MS, 20 g de Sacarose, 1 mg/L de IBA e água desionizada a perfazer um volume de 1000 ml. O pH do meio foi ajustado para 5,8 e de seguida adicionou-se 7 g de Agar; R2 - os *explants* da colheita I3 foram inicialmente imersos numa solução de 1 g/L de IBA durante 30 minutos e a seguir colocadas em 2,16 g/L de MS, 20 g de Sacarose e água desionizada a perfazer um volume de 1000 ml. O pH do meio foi ajustado para 5,8 e de seguida adicionou-se 7 g de Agar (Tabela 6). Em ambos protocolos de enraizamentos, os *explants* provenientes de I1, I2 e I3, foram colocados numa câmara com temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e total ausência de luz durante 4 dias a fim de potenciar o enraizamento (Druart, et al., 1982).

Tabela 6- Composição dos 2 meios de enraizamento utilizados no material estabelecido *in vitro*

	R1 (1000 mL)	R2 (1000 mL)
MS	2,16 g/L	2,16 g/L
Sacarose	20 g/L	20 g/L
IBA	1mg/L	1 g/L (imersão 30 minutos)
Agar	7 g/L	7 g/L
Material Colhido	I1 e I2	I3

Ainda no campo da Quinta do Valongo, Mirandela, foram escolhidas 5 variedades enxertadas sobre o porta-enxerto *gf677* e por observação e registo fotográfico do tronco faz-se a distinção do comportamento entre o *gf677* e a variedade acoplada (Figura 6).

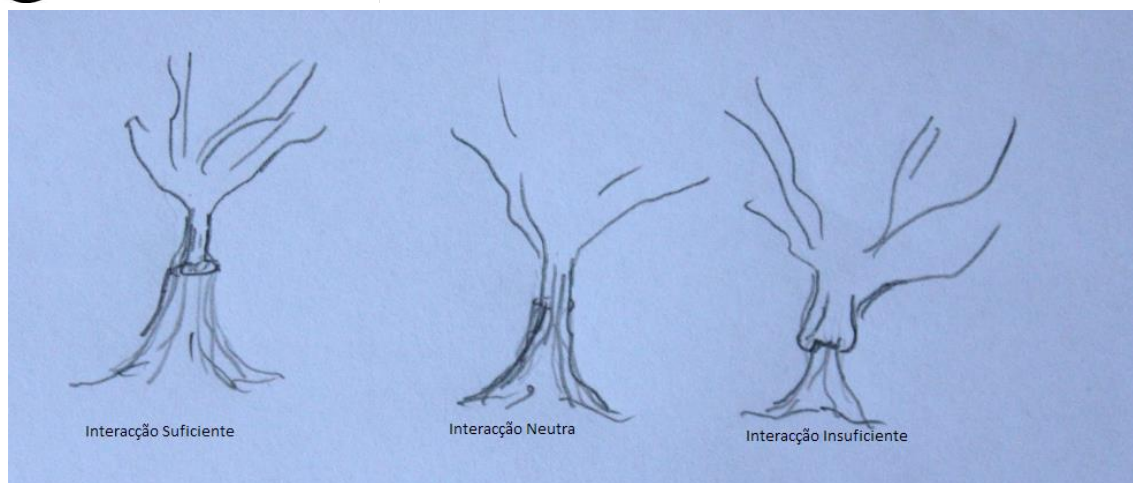


Figura 6- Esquema ilustrativo do comportamento de interação entre o porta-enxerto gf677 e a variedade acoplada.

Interação Suficiente, quando há maior engrossamento do porta-enxerto em relação a variedade enxertada; Interação Neutra ou Perfeita, quando o desenvolvimento no local de acoplamento não tem notórias diferenças entre cavalo e cavaleiro; e Interação Insuficiente, quando o porta-enxerto tem um desenvolvimento deficitário em relação a variedade nele enxertada.

4. Resultados e Discussão

4.1 Estádios Fenológicos

Foi efetuado o acompanhamento fenológico desde o estágio de dormência até à floração das diferentes variedades (Figura 7).































		Casa Nova	Parada	Verdeal	Guara	P. Amara
Gema de Inverno						
Aparecimento do Cálice						
Abertura da Flor						
Plena Floração						
Queda das Pétalas						

Figura 7 - Quadro de acompanhamento fenológico desde a dormência até à queda das pétalas nas variedades de Amendoeira

Gema de Inverno: Na variedade Guara o estado de dormência prolonga-se até ao final do mês de janeiro, sendo que nas variedades tradicionais é perfeitamente visível em meados do mês de dezembro.

Aparecimento do Cálice: As variedades Casa Nova, Parada e Amarga diferem muito pouco em tempo para o aparecimento do cálice, sendo a variedade Verdeal mais precoce cerca de dez dias. A variedade Guara continua distinta e mais tardia em relação a todas as outras variedades.

Abertura da Flor: Nesta fase todas as variedades seguem a mesma distância cronológica à exceção da variedade Amarga que se adianta cerca de uma semana. As

variedades Casa Nova e Parada têm este estado homogeneamente disperso pela planta a 21 de fevereiro, a variedade Verdeal adianta-se e atinge este estado a 11 de fevereiro.

A 5 de março é a variedade introduzida Guara que tem a abertura da flor completa por toda a copa.

Plena Floração: As variedades Casa Nova e Parada apresentam a plena floração nas mesmas datas, a Verdeal mantém a sua precocidade e tem a plena floração uma semana antes em relação às variedades anteriores, a variedade Amarga apresenta a sua plenitude floral ao mesmo tempo que a variedade Verdeal. No final da primeira dezena de março a variedade Guara aparece em plena floração.

Queda das Pétalas: As variedades Casa Nova e Parada mantêm a cadência e finalizam com a queda das pétalas na mesma data. A variedade Verdeal adianta este estado e tem a queda das pétalas quinze dias antes das anteriores variedades. A variedade Amarga também se adianta no ciclo em relação às primeiras variedades completando-o com dez dias de antecedência. A variedade Guara é mais tardia que todas as anteriores e tem a queda das pétalas já perto do final do terceiro mês. A evolução cronológica dos estádios fenológicos das variedades de Amendoeira acompanhadas pode ser observada na Figura 8.

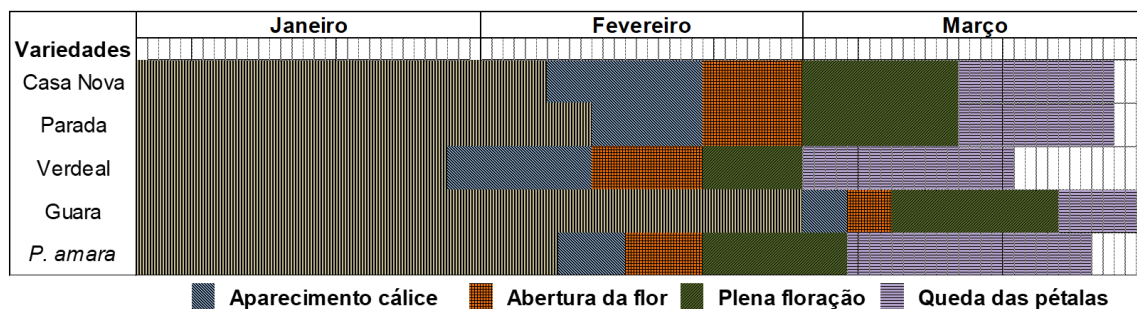


Figura 8 - Desenvolvimento das variedades Casa Nova, Parada, Verdeal, Guara e P. amara desde o aparecimento do cálice até à queda das pétalas, em 2017.

A coincidência de todos os estádios fenológicos entre as variedades Casa Nova e Parada pode explicar o facto de muitas vezes se encontrarem em conjunto nos mesmos campos de produção possibilitando a polinização cruzada.

A caracterização do porte é em todas as plantas caracterizada como porte aberto, isto deve-se a poda por mimetismo, em que de forma cultural se procede da mesma forma para todas as plantas.

A flor nas variedades Casa Nova e Parada é de cor rosada, já na variedade Verdeal é branca com ligeiro esverdeado. A variedade introduzida Guara tem uma flor branca tal como a variedade de *Prunus amara* (amêndoa amarga) em estudo.

4.2 Germinação *in vitro* do pólen

Dos quatro meios de germinação testados em 2016 verificou-se que o Meio C, possuindo 15% Sacarose, foi o que permitiu obter maiores percentagens de germinação (Tabela 7), sendo o mais indicado para as variedades usadas. Deste modo, em 2017 apenas foi usado este meio.

Tabela 7- Percentagem de germinação do pólen nos meios testados em 2016

	Parada	Bonita	Fura Sacos	Casa Nova	Verdeal
Meio A	12,33	12,66	12,66	13,00	14,66
Meio B	13,33	13,33	14,00	14,33	12,66
Meio C	16,00	14,66	16,33	15,66	15,00
Meio D	15,66	12,66	14,66	13,00	13,33

Os valores de 2017 para o Meio C foram visivelmente melhores que os obtidos em 2016 (Figura 9).

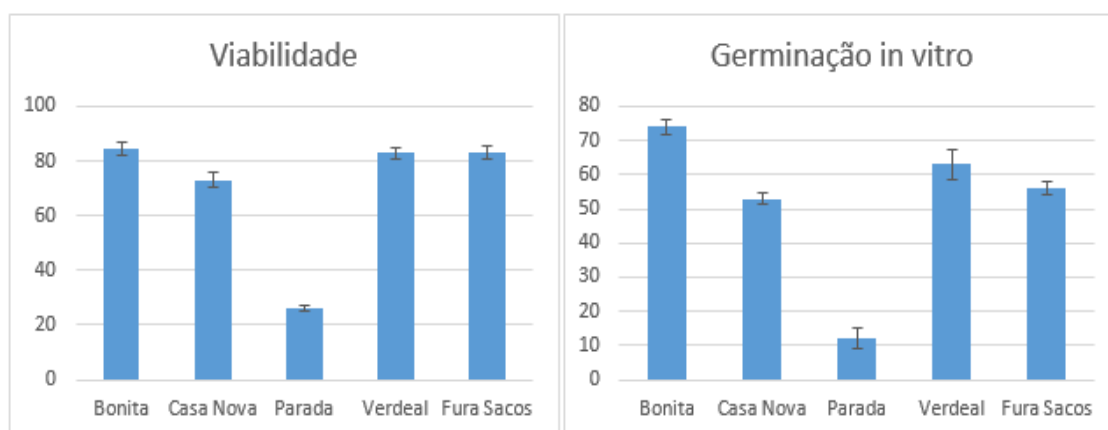


Figura 9- Valor médio da percentagem de Viabilidade e Germinação do pólen, utilizando o Meio C em 2017.

De entre as variedades testadas a Bonita foi a que apresentou maior viabilidade com 84,3% e desvio padrão de 2,31, no que diz respeito à germinação atinge os 74% com 2% de desvio padrão. A de índice menor foi a Parada com 26,3% de viabilidade e desvio padrão de 1,15, sendo o valor de germinação de 12% com desvio padrão de 3%. Em Portugal, são escassos os trabalhos realizados sobre a fertilidade polínica de variedades autóctones de amendoeira. Na análise de fertilidade do pólen das 5 variedades de *Prunus dulcis*, os resultados de viabilidade e germinação foram muito distintos, com viabilidades entre os 26% e os 84% e a germinação com valores entre 74% e 12%. Comparando os resultados obtidos com os de Sutyemez em 2011, em que a viabilidade atinge valores de 80% na variedade Guara e a germinação com 10% a 15% sacarose, ultrapassando os 50%, os valores das nossas variedades tradicionais indicam uma boa qualidade de pólen. Apenas a variedade Parada teve os valores mais baixos, com os seus 26% de viabilidade e 12% de germinação.

Tem sido admitido que o pólen necessita de cálcio no meio de germinação (Brewbaker *et al.*, 1963), com a função de estimular a formação do tubo polínico (Hepler, 2005) e para a manutenção da integridade da membrana citoplasmática (Stkveninck, 1965). No entanto nos meios de germinação que usamos não foi adicionado o cálcio. Pensamos que seria útil ensaiar outros meios com a adição de Cálcio quer na forma de nitrato quer na forma de cloreto e observar os resultados. Dado que a floração ocorre num período de tempo curto, não nos foi possível obter resultados concordantes entre a viabilidade e a germinação.

4.3 Micropropagação *in vitro* das variedades regionais

As Tabela 9, Tabela 10 e Tabela 11 fornecem os valores para explantes que se conseguiram estabelecer nos diferentes tratamentos I1, I2 e I3, respetivamente. Um mês após a inoculação dos explantes nos tratamentos I1 e I2, verificaram-se diferenças no número de sobreviventes principalmente na variedade Fura Sacos. A resposta da variedade Parada foi nula, pois não se conseguiu qualquer estabelecimento tanto em I1 e I2. A variedade Fura Sacos é, também, de todas a que mais se destaca em número de *explants* estabelecidos e visualmente mais desenvolvidas. No entanto, com o tratamento I3 conseguiu-se um maior número de explantes estabelecidos ao final de um mês acondicionados na câmara de crescimento a $23 \pm 2^\circ \text{C}$ e um fotoperíodo de 16 horas.

Tabela 8 – Número de ápices e entrenós inoculados, número de ápices e entrenós contaminados e número de ápices e entrenós estabelecidos, do Meio 1 da primeira colheita - I1

I1	Nº DE EXPLANTES					
	INOCULADOS		CONTAMINADOS/MORTOS		ESTABELECIDOS	
	VARIEDADE	ÁPICE	ENTRENÓ	ÁPICE	ENTRENÓ	ÁPICE
Verdeal	10	20	7	15	3	5
Casa Nova	10	20	8	20	2	0
Fura Sacos	10	20	5	13	5	7
Bonita	10	20	7	12	3	8
Parada	10	20	10	20	0	0

Tabela 9- Número de ápices e entrenós inoculados, número de ápices e entrenós contaminados e número de ápices e entrenós estabelecidos, do Meio 2 da primeira colheita – I2

I2	Nº DE EXPLANTES					
VARIEDADE	INOCULADOS		CONTAMINADOS/MORTOS		ESTABELECIDOS	
	ÁPICE	ENTRENÓ	ÁPICE	ENTRENÓ	ÁPICE	ENTRENÓ
Verdeal	10	20	7	13	3	7
Casa Nova	10	20	6	19	4	1
Fura Sacos	10	20	5	13	5	7
Bonita	10	20	9	19	1	1
Parada	10	20	10	20	0	0

Tabela 10- Número de ápices e entrenós inoculados, número de ápices e entrenós contaminados e número de ápices e entrenós estabelecidos, do Meio 1 da primeira colheita – I3

I3		Nº DE EXPLANTES					
VARIEDADE	INOCULADOS		CONTAMINADOS/MORTOS		ESTABELECIDOS		
	ÁPICE	ENTRENÓ	ÁPICE	ENTRENÓ	ÁPICE	ENTRENÓ	
Verdeal	10	10	5	7	5	3	
Casa Nova	10	10	6	9	4	1	
Fura Sacos	10	10	0	7	10	3	
Bonita	10	10	5	10	5	0	
Parada	10	10	4	10	6	0	

A variedade Parada teve 60% de sucesso no estabelecimento do corte do ápice quando não houve qualquer sucesso nos outros tratamentos.

O número de contaminados/mortos foi reduzido para valores inferiores, o que significa que o problema de infeções por fungos e bactérias pode ser praticamente eliminado na desinfeção dos cortes das plantas. Comparando o aparecimento de contaminações/mortes entre diferentes climas de colheita vemos que as diferenças

ajudam a confirmar que o número de infetados pode variar entre épocas do ano (Theiler-Hedtrich & Feucht, 1985).

Durante o estabelecimento registaram-se as imagens de acontecimentos como inoculados, contaminados/mortos e estabelecidos que seguem em baixo (Figura 10).

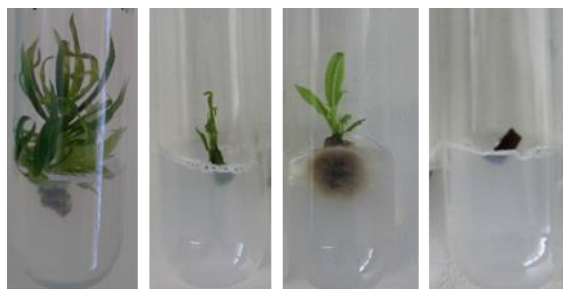


Figura 10- explantes estabelecidos (1 e 2), contaminado (3) e morto (4)

Todos os explantes estabelecidos dos Tratamentos I1, I2 e I3 que seguiram para enraizamento, ao fim de um mês de desenvolvimento no meio R1 na câmara de crescimento a $23 \pm 2^\circ \text{C}$ e um fotoperíodo de 16 horas, não se registou qualquer formação radicular. As plântulas da variedade Verdeal registaram maior desenvolvimento foliar quando comparadas com as variedades Bonita e Fura Sacos. Quanto as plântulas da variedade Casa Nova, estas não apresentaram quer desenvolvimento radicular quer foliar, apresentando até uma fisiologia retraída.

Um mês após a inoculação dos elementos tratados em R2, não encontramos qualquer crescimento radicular. As plântulas de R1, mantiveram-se viçosas com crescimento da parte aérea, já as tratadas com R2 apresentam um amarelecimento das folhas e total paragem de crescimento.

Ao perfazerem um período que excede os dois meses para todos os tratamentos em enraizamento, não se observou qualquer crescimento radicular, o que ultrapassa o tempo de aproximadamente 45 dias de outros autores segundo os mesmos material e métodos (Namli *et al.*, 2011).

Das variedades selecionadas a Verdeal e Fura Sacos parecem ser as que, de forma geral melhor respondem aos tratamentos efetuados e a variedade Parada apresenta dificuldade em se estabelecer. Em relação aos autores que estudaram outras variedades, o enraizamento das que foram estudadas neste trabalho parece mais difícil pois não está de acordo com o descrito nos resultados obtidos com o mesmo protocolo. A solução de manter as culturas em ambiente controlado o dobro do tempo parece ser descartável, pois foi testado esse efeito e não se observou qualquer evolução radicular.

4.4 Resposta da variedade ao porta-enxerto gf677

Apesar do calo formado na zona da enxertia, todas as variedades conseguem sobreviver, desenvolver-se e completar o ciclo anual com produção de fruto (Figuras 11, 12, 13, 14 e 15).



Figura 11- Resposta da variedade Casa Nova ao porta-enxerto gf677.



Figura 12- Resposta da variedade Parada ao porta-enxerto gf677.



Figura 13- Resposta da variedade Verdeal ao porta-enxerto gf677.



Figura 14- Resposta da variedade Bonita ao porta-enxerto gf677.



Figura 15- Resposta da variedade Fura Sacos ao porta-enxerto gf677.

A calosidade é mais definida nas variedades Verdeal e Fura Sacos, já a variedade Parada tem um menor calo visível. A variedade enxertada apresenta sempre um maior espessamento que o porta-enxerto utilizado, sendo assim e segundo o nosso guia observou-se uma interação insuficiente.

5. Conclusões gerais

As variedades tradicionais apresentam diferenças entre elas em relação ao tempo de floração, fertilidade polínica, germinação *in vitro*, e comportamento à enxertia mas todas conseguem concluir o ciclo anual com produção de fruto. Casa Nova e Parada são as variedades tradicionais com maior representação na região em estudo e têm uma cronologia de floração muito aproximada, possibilitando a polonização cruzada e isto já que a variedade Parada apresenta índices de viabilidade polínica muito inferiores às demais.

A escassez de estudos com foco nas variedades autóctones é uma das barreiras à produção destas plantas por micropropagação e uma vez que durante os trabalhos efetuados neste estudo não se conseguiu total sucesso com os meios utilizados, com a nulidade no enraizamento, seriam necessários mais ensaios com outros meios para procurar a produção competitiva destas variedades.

Todas as plantas tem sucesso com a utilização do porta-enxerto *gf677*, que é o mais utilizado nas plantas introduzidas, logo seria de esperar uma boa relação de enxertia caso procedêssemos à multiplicação de variedades tradicionais *in vitro* e posteriormente à enxertia no *gf677*.

A preservação do material genético autóctone é uma mais valia para a diversidade genética.

6. Referências

- AATM. 2016.** [entrev.] Tiago Rachado. Torre de Moncorvo, Fevereiro de 2016.
- accuweather. 2016.** [accuweather.com/pt. \[Online\]](http://www.accuweather.com/pt/pt/mirandela) 2016.
<http://www.accuweather.com/pt/pt/mirandela>.
- Alonso, J.M., Kodad, O., Gradziel, T.M. 2012.** Almond. In: Badenes ML, Byrne DH, editors. Fruit Breeding. Springer US, Boston, MA, 2012, pp. 697-728.
- Antonelli, M. 1992.** Regeneration from almond cotyledons: induction of proembryonal masses. *Acta Horticulturae* 300:255–260.
- Assunção, A.V. 2014.** Jornadas Técnicas da Amêndoa. Alfândega da Fé: UTAD/CITAB, 23 de Maio de 2014.
- Bandeira, F. S., Xavier, A., Otoni, W. C., Lani, E. R. G. 2007.** Aclimatização ex vitro de plantas propagadas pela enxertia in vitro de clones de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*. *Revista Árvore* Vol. 31 (5).
- Boavida, L.C., McCormick, S. 2007.** Temperature as a determinant factor for increased and reproducible in vitro pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 52: 570–582.
- Bonga, J.M, Von Aderkas, P. 1992.** In Vitro Culture of Trees. *Forestry Sciences* Vol. 38.
- Brewbaker, J.L, Kwack, B.H. 1963.** The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *American Journal of Botany* 50, 859-865.
- Chuine, I., Kramer, K., Hänninen, H. 2003.** Plant development models. Phenology: Na Integrative Environmental Science, M. D. Schwartz, ed., Kluwer Academic Press, Pp 217-236.
- Dafni, A., Firmage, D. 2000.** Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Systematics and Evolution* 222, 113-132.
- Daher F B., Chebli Y, Geitmann A. 2009.** Optimization of conditions for germination of cold-stored *Arabidopsis thaliana* pollen. *Plant Cell Reproduction* 28(3):347-57
- Dimassi-Theriou, K. 1995.** In vitro rooting of rootstock GF-677 (*Prunus amygdalus* x *Prunus persica*) as influenced by mineral concentration of the nutrient medium and type of culture-tube sealing material. *Journal of Horticultural Science* 70(1):105-108
- Druart, P.H., Kevers, C.L., Boxus, P.H., Gaspar, T.H. 1982.** In vitro promotion of root formation by apple shoots through darkness effect on endogenous phenols and peroxidases. *Z. Pflanzenphysiol* 108:429-436.
- Erig, A., Schuch, M. 2005.** Estabelecimento in vitro de mirtilo a partir de segmentos nodais. *Scientia Agraria*, 6(1): 91-96.
- Ferreira, M., Caldas, L., Pereira, E. 1998.** Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Feira de Santana* 4(7):121-127.

- Filiti, N., Montuschi, N., Rosati, P. 1987.** histoanatomical aspects on Prunus rootstock. *Advances in Horticultural Science*, 1:34-38.
- Fuchigami, L., Kobayashi, K. 1982.** Plant Cold hardiness and Freezing Stress. *Forest Ecol. and Forest Soils*, 35,
- Grasselly, C., Duval, H., Belluau, E. 1997.** L' amandier. Paris Monografie ISBN: 2-87911-083-1..
- Hartmann, H. T, Kester, D. E., Davies, F.T. 1990** .Theoretical aspects of grafting and budding. In *Plant propagation*.
- Hepler, P.K. 2005.** Calcium: A central regulator of plant growth and development. *The Plant Cell*, 17(8):2142-55.
- Heslop-Harrison, J., Heslop-Harrison, Y., & Shivanna, K. R. 1984.** The evaluation of pollen quality and a further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure. *Theoretical and Applied Genetics*, 67, 367-375.
- INE. 2013.** <https://www.ine.pt/>. [Online] 2013. https://www.ine.pt/ngt_server/attachfileu.jsp?look_parentBoui...att_display....
- Kwack, B, Brewbaker, J. 1961.** Plant Physiology. *American Journal of Botany*. 50.
- Leith, H. 1974.** *Phenology and Seasonality Modeling*. Springer Verlag, New York.
- Monteiro, A. M., Cordeiro, V.P., Gomes-Laranjo, J. 2003.** *A Amendoeira*. Mirandela : João Azevedo Editor, 2003.
- Monticelli, S., Puppi, G., Damiano, G. 2000.** Effects of In vivo mycorrhization on micropropagated fruit trees rootstocks. *Applied Soil Ecology* 15: 105-111.
- Moore, R A. 1984.** Model for graft compatibility - Incompatibility in higher plants. *American Journal of Botany* 71, 752-758
- Murashige, T e Skoog, F. 1962.** A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.
- Namli, S., Isikalan, C., Akbas,F., Basaran, D. 2011, et al. 2011.** Improved in vitro rooting of almond cultivar 'Nonpareil'. *Plant Omics Journal* 4, 14-18.
- Nepi, M., Franchi, G. 2000.** Cytochemistry of mature angiosperm pollen. *Pollen and Pollination* 222, 45-62.
- Pereira, I. S., Fachinelloll, J.C., Antunes, L. E. C., Campos, A.D., Pina, A. 2014.** Incompatibilidade de enxertia em Prunus. *Ciência Rural* 44, 1519-1526 .
- Peres, L.E.P. 2002.** Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas in vitro. *Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento* 25, 44-48.
- Potts, B., Marsden-Smedley, J.B. 1989.** In Vitro Germination of Eucalyptus Pollen: Response to Variation in Boric Acid and Sucrose. *Australian Journal of Botany* 37, 429-441
- Reighard, G. L., Loreti, F. 2008.** Rootstock Development. *The Peach*. Cap 8, pp193.

Rocha, M.A.C., Costa, M. A. P. C., Silva, S.A., Ledo, C. A. S., Moreira, M. J. S., Bastos, L. P. 2008. Enraizamento in vitro e aclimatização de genótipos de jenipapeiro. *Rev. Bras. Frutic.* 30 (3), 769-774.

Potts, B e Marsden-Smedley, J. 1989. In Vitro Germination of Eucalyptus Pollen: Response to Variation in Boric Acid and Sucrose. *Australian Journal of Botany* 37, 1989.

Rugini, E., Verma, D.C. 1982. Micropropagation of difficult to propagate almond (*Prunus amygdalus*, Batsch) cultivar. *Plant Science Letters* 28, 273-281.

Salaya, G. F.G. 1999. Fruticultura: el potencial productivo : crecimiento vegetativo y diseño de huertos y viñedos. Colección de textos universitarios: Agronomía.

Silveira, R.L.V.A. 2001. *Seja o doutor do seu eucalipto*. s.l. : Potafos, 12, 16pp. Arquivo de Agronomo

Stanley e Linskens. 1974. *Pollen: biology, biochemistry and management*. Springer, New York : s.n., 1974.

Van Stkveninck, R.K.M. 1965. The significance of calcium on the apparent permeability of cell membranes and the effects of substitution with other divalent ions. *Physiologia Plantarum*. 18(1):54-69.

Theiler-Hedtrich, C M e W, Feucht. 1985. Micropropagation of *Prunus cerasus* rootstocks - influence of culture medium constituents on growth in stage I and II. *Acta Horticulturae* 169: 335-340.

Titon, M, Xavier, A e Otoni, W. 2006. Clonal propagation of *Eucalyptus grandis* using the mini-cutting and microcutting techniques. *Scientia Forestalis*. 71:109-117.

Wang, Q., Lu, L., Wu, X., Li, Y., Lin, J. 2003. Boron influences pollen germination and pollen tube growth in *Picea meyeri*. *Tree Physiology*. 23(5): 345-351.